

多機能 Plant Efficiency アナライザ M-PEA でわかること

吉原晶子、倉谷美帆、戸次咲恵、小林康一
大阪公立大学大学院理学研究科生物学専攻

2023年12月15日

1. はじめに

M-PEA (Multifunctional Plant Efficiency Analyser) は、625 nm の励起光に由来するクロロフィルの即時蛍光 (prompt fluorescence, PF) と 820 nm の変調赤外光の反射光 (modulated light reflection, MR) を同時に高速で測定できる装置である。それらに加え、遅延蛍光 (delayed fluorescence, DF) の測定も可能にするオプションがあるが、本稿では、PF と MR についての測定例を紹介する。

2. 測定原理

2-1. PF の測定による OJIP 曲線の取得

植物では、室温におけるクロロフィルの蛍光の大部分は光化学系 II のアンテナに由来する。この光化学系 II のクロロフィルから放出される蛍光には、光合成に関する様々な情報が含まれている。暗順化した植物に光を照射すると、クロロフィル蛍光は初期状態 (O) から急速に上昇し、200 ミリ秒後あたりでピーク (P) に達する。このクロロフィル蛍光の上昇を高い時間分解能で測定し、対数時間軸でプロットすると、O から P までの間に 2 つのステップが認められる。2~3 ミリ秒後のステップは J、30 ミリ秒後のステップは I とラベルされ、それらを経由したクロロフィル蛍光誘導は OJIP 曲線とよばれる (図 1) ⁽¹⁾。

十分に暗順化したサンプルでは、光化学系 II の電子受容側が完全に酸化しており、最小の蛍光強度 (F_0) を示す。その後、強い光照射により光合成電子伝達鎖が徐々に還元していくと、光化学系 II の初期電子受容体である Q_A の還元レベルを反映して、クロロフィル蛍光が増大する。このとき、J ステップは、プラストキノンプールが還元され始める時点に相当し、I ステップは、シトクロム b_6/f の還元が始まる時点に相当すると考えられている⁽²⁻⁴⁾。その後、照射した光が飽和レベルであった場合は、P の蛍光は最大値 (F_M) に達する。この蛍光上昇のキネティクスを解析することで、光合成電子伝達鎖の機能状態を知ることができることから (表 1)、OJIP 曲線は、阻害剤やストレス、変異などが光合成装置へ与える影響を調べるための有効なツールとして用いられている。

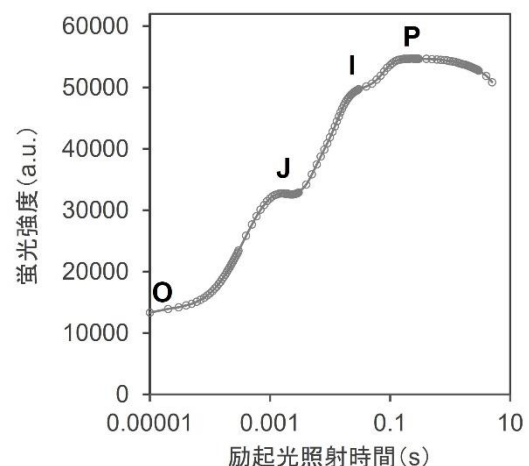


図 1. OJIP 曲線の例

表 1. OJIP 曲線の各成分の説明

ステップ	励起光照射時間	説明
O	0 ms	光化学系 II の電子受容側が最も酸化した状態。本装置では 0 ms の蛍光値は原理的に取れないが、最小二乗回帰から導出することができる。
O-J フェーズ		光化学系 II の初期電子受容体の還元 (QA の蓄積) を反映する。
J	3 ms	プラストキノン (PQ) プールの還元の開始時点を反映する。
J-I フェーズ		(部分的な) PQ プールの還元 (プラストキノールの蓄積) を反映する。
I	30 ms	シトクロム b_6f の還元の開始時点 (シトクロム b_6f による PQ プールの再酸化) を反映する。
I-P フェーズ		光化学系 I の電子受容側の還元を反映する。
P	300-500 ms	最大蛍光強度に達した時点。還元的ペントースリン酸回路が活性化し始める。この後、非光化学的消光などにより蛍光値は減少していく。

2-2. MR の測定による光化学系 I の酸化還元解析

光化学系 I の反応中心クロロフィルである P-700 の酸化還元状態は、その吸収変化を測定することで知ることができる。P-700 が酸化されると、クロロフィルカチオンによる吸収が増大するため、800 nm より長波長の赤外領域の吸収が増加することが知られている。M-PEA では、820 nm の変調赤外光に由来する反射光を測定することで、P-700 の酸化還元に起因する吸収変化を、PF と同時に高い時間分解能で測定することができる。ただし、赤外光の吸収変化はフェレドキシンやプラストシアニンの酸化還元によってもおこるため、MR にはその情報も混在していることに注意が必要である。Schansker et al. (2003)によれば、820 nm の吸収変化のうち、40-50%はプラストシアニンに由来することが示されている⁽⁵⁾。

3. 実際の測定例

播種後 14 日目のシロイヌナズナの第 1 または第 2 本葉を、バッファーのみの溶液、40 μ M DCMU 溶液、1 mM メチルビオローゲン (MV) 溶液のいずれかで処理し、暗順化 (~30 分) したのち、励起光 (625 nm, 3000 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$) を 5 秒間照射することで、PF と MR を測定した。文献に従い⁽⁶⁾、励起光の照射開始後 0.02 ミリ秒の時点での蛍光強度を F_0 とし、0.7 ミリ秒の時点での反射光強度を MR_0 とした。なお、M-PEA には、0 ミリ秒の時点での F_0 を推測する機能があり、その値を使うことも可能である。図 2 では、測定された PF の実測値を示した。MR については、反射赤外光の微細な変化を測定しており、測定回によってシグナルの絶対値が大きく変わるため、 MR/MR_0 としてノーマライズした値を示した。

バッファーのみを処理した葉の場合では、過去の報告通り、2 ミリ秒後に PF の J ステップが現れ、30 ミリ秒後あたりで I ステップが見られた (図 2A)。このとき、 MR/MR_0 は 10 ミリ秒まで減少を続けた後に上昇に転じ、200 ミリ秒ほどでピークに達した。つまり、励起光照射で酸化され始めた P-700 とプラストシアニンは、J-I フェーズの間に最も酸化された状態になり、その後、I-P フェーズにおいて光化学系 II から供給された電子により還元されていき、P の時点で最も還元された状態に達したと読み取ることができる。

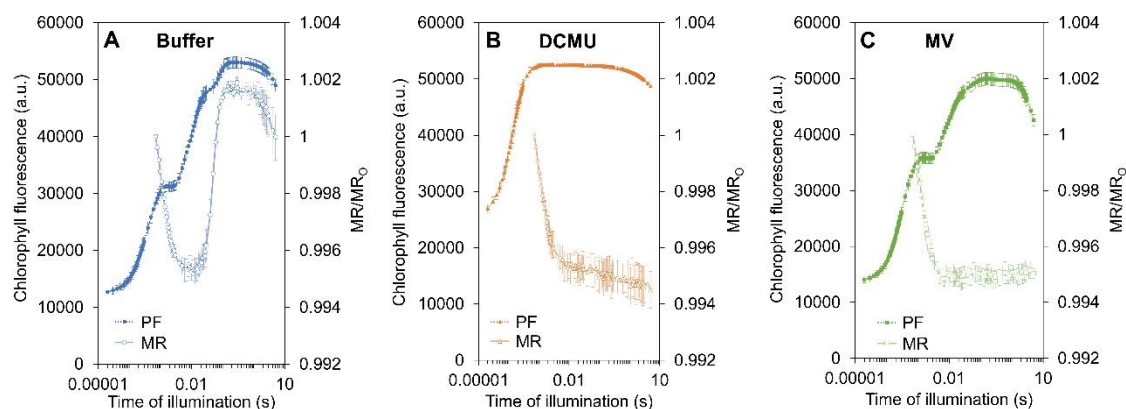


図 2. OJIP 曲線と MR 曲線

(A) バッファーのみを処理した葉。(B) 40 μM DCMU を処理した葉。(C) 1 mM MV を処理した葉。シロイヌナズナの葉と各溶液をシリンジに入れ、シリンジの先端を指で塞いでポンピングすることで溶液を葉に減圧浸透させた。データは 3 回の実験の平均 \pm 標準誤差で示した。

DCMU は、 Q_A から Q_B への電子伝達 (Q_A の再酸化) を阻害する⁽⁷⁾。DCMU を処理した葉では、J が大きく増加し、I が消失した (図 2B)。この結果は、初期の光化学反応の段階で Q_A が完全に酸化された状態になり、PF が最大値に達したことを示唆する。このとき、P-700 は、光照射により最大レベルまで酸化された後は、再度還元されることなく、ずっと同じ酸化状態で維持された。これは、 Q_A から Q_B への電子伝達が DCMU によって阻害されたことで、光化学系 I が光化学系 II からの電子によって再還元されなかったからである。ちなみに、 F_0 の値が DCMU 処理で高くなったのは、DCMU の阻害作用により Q_A が暗所で完全に酸化されていなかったことが原因であると考えられる。今回、葉を装置にセットする際には微弱な緑色光を用い、その後 1 分間の暗所処理を行ったが、この操作では、DCMU 存在下で Q_A を完全に酸化するには不十分だったのだろう。

MV は、光化学系 I の鉄硫黄クラスターから電子を受け取り酸素へ渡すため⁽⁸⁾、光化学系 I の受容側における“電子の詰まり”を強制的に解消する。MV を処理した葉では、バッファー処理と同様に、30 ミリ秒後あたりに顕著な J ステップが見られた (図 2C)。MV が光化学系 II の光化学反応を反映する O-J フェーズに大きな影響を与えなかったのは、この試薬が光化学系 I から電子を受け取る物質であることを反映している⁽²⁾ (ただし、本実験において、J ステップの蛍光がバッファー処理よりも MV 処理で高かった理由は不明である)。一方、I-P フェーズでは、MV による影響が明らかであり、MV 処理した葉では、I ステップから P ステップへの蛍光の上昇が見られなかった。MV 存在下では、PF は F_M に達することなく、その後の非光化学消光による蛍光の減少期に転じたと考えられる。I-P フェーズは、光化学系 I の電子受容側の還元状態を反映する。MV はこのフェーズにおいて、光化学系 I から電子を奪うことで光化学系 I の酸化を著しく速め、結果として上流での Q_A の完全還元を妨げたと考えられる。実際に、MR 測定において、P-700 は光照射により酸化された後、再還元されることは無かった。これは MV による電子の引き抜き効果によるものであろう。

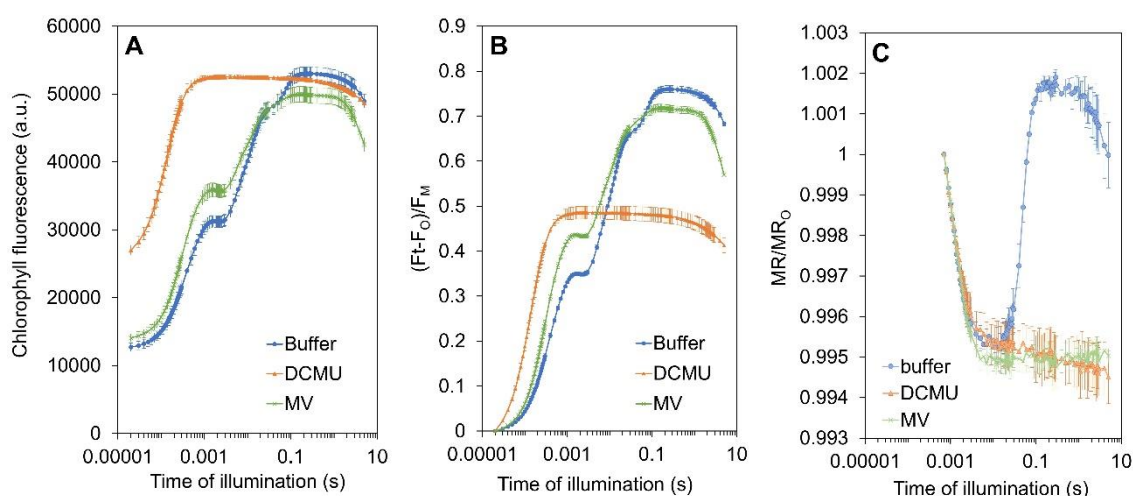


図 3. バッファー、DCMU、MV の三つの条件の比較

(A) PF の実測値。(B) F_0 と F_M でノーマライズした PF。(C) MR/MR_0 。データは図 2 と同じもので、3 回の実験の平均 ± 標準誤差である。

PF の実測値を 3 条件で比較すると、DCMU 処理では F_0 が高く、MV 処理では F_M が低いことが分かる (図 3A)。 F_0 と F_M でノーマライズした値を見ると、DCMU 処理では F_0 の上昇により、MV 処理では F_M の低下により、 $(F_t - F_0)/F_M$ の最大値、すなわち光化学系 II の最大量子収率 $(F_M - F_0)/F_M$ が、バッファー処理と比べ低下していた (図 3B)。DCMU 処理では暗所での Q_A の酸化が、MV 処理では飽和光下での Q_A の還元がそれぞれ不十分であることが、光化学系 II の最大量子収率の見かけ上の低下を引き起こしたと考えられる。つまり、DCMU や MV は、光化学系 II が光化学反応を行う能力そのものを低下させているわけではないことに留意する必要がある。

MR/MR_0 を 3 条件で比較すると、光照射後から 7 ミリ秒の時点までは、DCMU 処理でも MV 処理でも、バッファー処理と光化学系 I の酸化速度はほとんど変わらなかった (図 3C)。このことから、光化学系 I の初期の酸化速度には、光化学系 II からの電子供給も、光化学系 I の電子受容側の還元状態も、ともに影響しないことが分かる。光照射直後の MR/MR_0 の低下速度は、光化学系 I が P-700 やプラストシアニンを酸化させる速度に依存し、例えば光化学系 I のアンテナサイズなどの影響を受けることが知られている。一方で、光照射後 7 ミリ秒以降にみられる MR/MR_0 の上昇速度には、光化学系 I の上流からの電子の流入と光化学系 I の下流への電子の流出がともに大きく影響する。つまり、光照射下での MR/MR_0 を詳細に解析することで、P-700 の総量や反応収率は分からないが、光化学系 I を介した電子の流れを把握することができる。また、今回の我々の解析には含まれていないが、赤色光-遠赤色光-赤色光の 3 段階の MR 測定により P-700 の最大酸化還元レベルを評価した報告もあり⁶⁾、M-PEA を用いた P-700 の機能状態の詳細な解析も可能となっている。

今回、阻害剤を加えた際の PF と MR のキネティクス変化についての測定例を紹介したが、グラフの比較だけでなく、OJIP 測定と MR 測定に基づいた様々な光合成パラメーター

が提案されている。詳しくは、Strasser et al. (2010)⁽⁶⁾などの論文を参考にされたい。

4. 補足情報

今回の測定では、我々は、DCMU や MV を瞬時に葉の細胞内に取り込ませるために、これらの試薬を 150 mM sorbitol-50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)溶液にそれぞれ 40 μ M と 1 mM の濃度で溶かし、シリンジを用いた減圧浸透法により浸潤させた。しかし、この方法により葉に溶液が浸透したことで、葉が透明化し、MR シグナルが大きく減少してしまった。S/N 比が低くなり正確な測定が困難となったことから、反射光の増大を目的とし、葉を白い硬質塩化ビニール板に両面テープで貼り付け、測定用クリップに挟むことにした (図 4A-C)。その結果、白板を使わなかったときと比べ、MR シグナルが 2 倍程度上昇し、PF のシグナルも同様に増加することとなった (図 4D, E)。本稿のデータは、すべて白板を用いて測定したものである。ただし、この手法の是非については、別途検討が必要である。

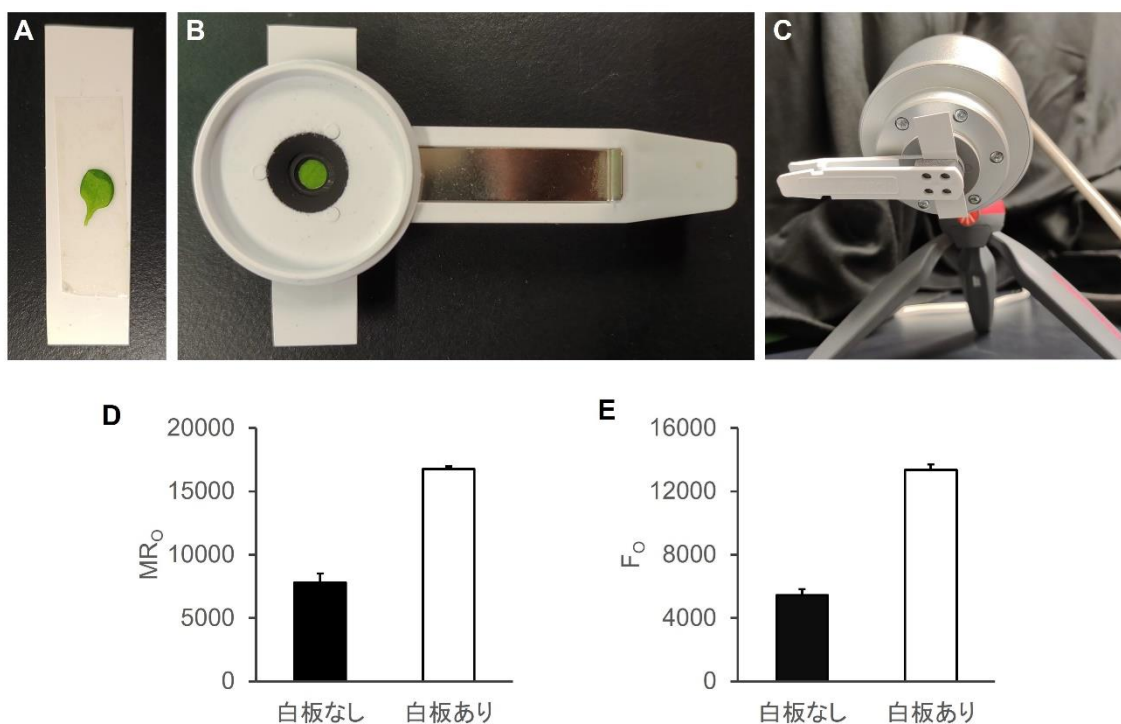


図 4. 白いプラスチック板の利用

(A) 白いプラスチック板に両面テープで貼り付けたシロイヌナズナの葉。PF の実測値。(B) プラスチック板ごと、サンプルホルダーに挟んだ状態。(C) M-PEA のセンサーヘッドにサンプルホルダーを取り付けた様子。白板を用いたことで、MR と PF の値が 2 倍以上増加した。(D)と(E)は、白板を使わなかった時と使ったときの MR₀ と F₀ の値を示す (3 回の実験の平均 \pm 標準誤差)。

5. 参考文献

1. R. J. Strasser, Govindjee, “The Fo and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae” in *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, J. H. Argyroudi-Akoyunoglou, Ed. (Springer US, Boston, MA, 1992; https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3366-5_60) *Nato ASI Series*, pp. 423–426.
2. G. Schansker, S. Z. Tóth, R. J. Strasser, Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1706**, 250–261 (2005).
3. S. Z. Tóth, G. Schansker, R. J. Strasser, In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1708**, 275–282 (2005).
4. S. Z. Tóth, G. Schansker, R. J. Strasser, A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth Res* **93**, 193–203 (2007).
5. G. Schansker, A. Srivastava, R. J. Strasser, Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct Plant Biol* **30**, 785–796 (2003).
6. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, S. Qiang, V. Goltsev, Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**, 1313–1326 (2010).
7. B. R. Velthuys, Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Letters* **126**, 277–281 (1981).
8. T. Fujii, E. Yokoyama, K. Inoue, H. Sakurai, The sites of electron donation of Photosystem I to methyl viologen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1015**, 41–48 (1990).